Mathematisches Modell zur Ermittlung inkorporierter Radioaktivitätsmengen aus den Photometermeßwerten von Tritium-Autoradiogrammen in der Neuroanatomie

von

Johann - Josef Jennissen

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0057

Aus dem C. und O. Vogt - Institut für Hirnforschung
der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. A. Hopf

Mathematisches Modell zur Ermittlung inkorporierter Radioaktivitätsmengen aus den Photometermeßwerten von Tritium-Autoradiogrammen in der Neuroanatomie

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Johann - Josef Jennissen

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
gez.: Prof. Dr. Straßburg

Referent
gez.: Prof. Dr. Hopf

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Hilscher

Seite

1. EINLEITUNG 1

1.1 Problematik der Auflösung 1

1.2 Anwendungsbeispiele 2

1.3 Versuche einer Quantifizierung 2

2. MATERIAL UND METHODE 4

2.1 Aufnahme der Meßwerte 8

2.2 Auswertung 10

3. ERGEBNISSE 15

4. DISKUSSION 21

4.1 Fading 22

4.2 Geometrische Fehler 23

4.3 Rückwärtsstreuung 25

4.4 Chemographie 26

4.5 Background 27

4.6 beta-Absorption 28

4.7 Quantitative Auswertemöglichkeiten 34

4.7.1 beta-track-counting 34

4.7.2 grain-density 37

5. ZUSAMMENFASSUNG 44

6. LITERATUR 45

1. Einleitung

Die sprunghaft zunehmende Anwendung der Histoautoradiographie in der Hirnforschung beruht vor allem auf dem Vorzug dieser Methode, feinere strukturelle Zuordnungen und Korrelationen morphologischer, physiologischer und biochemischer Daten zu ermöglichen. Eine Zerstörung von Strukturen, wie sie etwa bei Degenerationsmethoden in der Neuroanatomie oder bei der biochemischen Untersuchung des Gehirns an Homogenaten oder Zentrifugaten sonst erforderlich ist, wird bei dieser Methode vermieden.

1.1 Problematik der Auflösung

Nachdem in frühen Experimenten (GERARD, 1932; YOUNG, 1945; SAWYER, 1946) der axoplasmatische Transport von Substanzen in der Neuroanatomie vermutet wurde, erfolgten die ersten autoradiographischen Untersuchungen (SAMUELS, 1951), welche die Hypothese von Gérard bestätigen konnten. In der Neuroanatomie wurden zum Studium des zentrifugalen Stofftransportes in der Anfangsphase autoradiographischer Untersuchungen ^{32}P oder ^{35}S verwendet. Niederenergetische beta-Strahler, z.B. ^{14}C oder ^{3}H, kamen erst später hinzu. Deren geringere Strahlungsenergie (E_{max} ^{3}H = 18 KeV, E_{max} ^{14}C = 156 KeV) bot die Möglichkeit, differente Radioaktivitätsmengen über immer kleineren anatomischen Strukturbereichen zu erfassen. Dank der Tritium-autoradiographie gelang die Korrelation Silberkorn zu Struktur im elektronenmikroskopischen Bereich (SALPETER, BACHMANN, 1964), die schließlich von HENDRICKSON (1969) und DROZ et al. (1975) bis zum Nachweis von Proteinen ausgebaut wurde.

1.2 Anwendungsbeispiele

Hauptanwendungsgebiete autoradiographischer Methoden in der Neuroanatomie sind Untersuchungen der axoplasmatischen Transportvorgänge und der Faserverbindungen (KOENIG, 1958; DROZ, LEBLOND, 1963). Die Autoradiographie bietet jedoch auch die Möglichkeit, Verbindungen verschiedener Projektionssysteme (MAI, 1976; MAI und JUNGER, 1977; HENDRICKSON et al., 1972) und funktionskinetische Untersuchungen - basierend auf der 'Dynamik' des axonalen Transports - zu erfassen. Weiterhin ermöglicht sie u.a. physiologische Untersuchungen, z.B. zellkinetische Studien (MAURER und SCHULTZE, 1963; DÖRMER, 1979) als auch eine Bestimmung der Verteilungsmuster von Pharmaka (HOPF und ECKERT, 1968; ORSULAKOVA et al.,1977).

1.3 Versuche einer Quantifizierung

Im Anfangsstadium der Anwendung autoradiographischer Technik standen qualitative Untersuchungen im Vordergrund. Bald jedoch entstand der Wunsch, wie in der Biochemie den Anteil der Radioaktivität einzelner Kompartimente zu ermitteln. Hierfür reichte der nur qualitative Nachweis nicht mehr aus. Versuche einer Quantifizierung durch die Bestimmung von Anzahl oder Verteilungsmuster der über den zu untersuchenden Strukturen liegenden Silberkörnern wurden schon sehr früh unternommen. LEVINTHAL und THOMAS (1957) gelang es, den Phosphor-Gehalt in Bacteriophagen durch ß-track-counting zu bestimmen. ROSS et al.(1949, 1956) nutzten das Kriterium von track-Länge und Silberkorndichte zur Bestimmung der Energie verschiedener

beta-Strahler. SCHULTZE und MAURER (1963) ermittelten die Größe der RNS-Synthese in Nukleolus und Karyoplasma verschiedener Zellarten der Maus mit Hilfe Tritium markierten Uridins. BARNARD et al. (1969, 1970) gelang eine Aussage über die Verteilung von Acetylcholinesterase an motorischen Endplatten. MAI und JUNGER (1977) konnten die Existenz retinohypothalamischer Verbindungen bei der Ratte durch Anwendung semiquantitativer und statistischer Methoden eindeutig nachweisen. In allen diesen autoradiographischen Experimenten wird der 'digitale' Charakter der Silberkörner ausgenutzt. Bei autoradiographischen Messungen ersetzt die photographische Emulsion mit den in ihr entstehenden Silberkörnern die in der Biochemie üblichen Methoden der Aktivitätsbestimmung. Prinzipiell erlaubt der schon oben erwähnte 'digitale' Charakter der Silberkörner eine quantitative Autoradiographie. Daß dennoch in der Vergangenheit wenige wirklich quantitative autoradiographische Untersuchungen durchgeführt wurden, liegt an dem Einfluß unvermeidbarer Störfaktoren auf die Silberkornverteilung: Fading, geometrische Bedingungen, Chemographie, Background und ß-Absorption sind sowohl zeit- als auch präparationsabhängig. Eine quantitative Auswertung der Silberkornverteilung ohne Berücksichtigung dieser Fehlerquellen führt zu falschen Ergebnissen hinsichtlich inkorporierter Radioaktivitätsmengen.

Ziel dieser Arbeit ist die rechnergestützte automatische Auswertung von Autoradiogrammen, die verläßliche Angaben über die Menge inkorporierter Radioaktivität gestattet, korreliert mit histologischen und morphometrischen Daten.

2. Material und Methode

Versuchstiere waren 40 Ratten vom Stamme Hn Wistar-II mit einem Gewicht von 300 g. Allen Tieren wurden radioaktiv (^{3}H) markierte Aminosäuren unterschiedlicher Aktivitäten durch den Limbus Corneae in den Glaskörper injiziert.
Folgende Aminosäuren wurden verwendet:
Leucin, Prolin und Tyrosin.

Die Injektionen erfolgten mit Hamilton-Spritzen (Spritzen mit einem Fassungsvermögen von 50 mikroliter). Nach Überlebenszeiten zwischen 12 Stunden und 24 Tagen wurden die Tiere getötet und der zum injizierten Auge gehörende Nervus opticus präpariert.

Siehe Abbildung 1), Seite 5

Die sequentiell in einer Dicke von 5 µm geschnittenen Nervi optici wurden nach dem in Abbildung 1) beschriebenen Verfahren zusammen mit Standardschnitten auf einen Objektträger aufgebracht. Um eventuelle Fehler durch differente Wanderungsgeschwindigkeiten entlang eines Nervus opticus zu erfassen, wurde jeweils ein Schnitt durch den proximalen und distalen Sehnervenanteil auf dem gleichen Objektträger aufgebracht.

Die entparaffinierten Schnitte wurden entsprechend den Angaben von KOPRIVA und LEBLOND (1962) und COWAN et al. (1972) bei 44 ^{o} C in KODAK NTB-II Emulsion eingetaucht (Verdünnungsverhältnis 1:1),

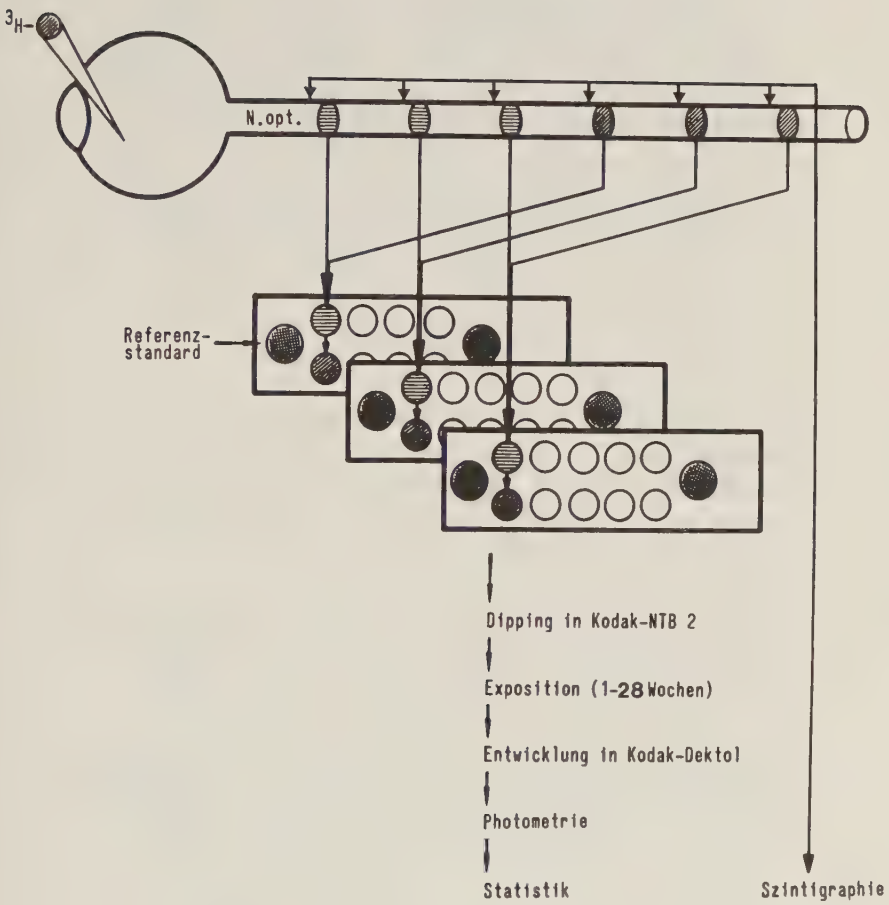


ABBILDUNG 1)
Präparation und Verteilung der Schnitte
auf dem einzelnen Objektträger
proximaler Nervenanteil
distaler Nervenanteil
Schnitte anderer Nerven
Referenzstandard

getrocknet und in lichtdichten, versiegelten Kästen bei einer konstanten Temperatur von 4° C gelagert. Zusätzlich wurde jedem Behälter Blaugel als Trocknungsmittel hinzugefügt, um eine Verfälschung des Autoradiogramms durch differente Feuchtigkeit zu vermeiden.

Nach einer Expositionszeit von 1 - 28 Wochen wurden die Objektträger mit den Schnitten bei 18° C für 2,5 Minuten in KODAK-DEKTOL entwickelt, gewässert, in Acidofix (AGFA-GEVAERT) 6 Minuten fixiert und in fliessendem entionisierten Wasser für 3 x 5 Minuten gewässert.

Standardreferenzquelle war ein ^{3}H dotiertes Poly-n-butyl-methacrylat der Fa. AMERSHAM-BUCHLER mit einer spezifischen Aktivität von 50 µCi = 1.85 MBq. Dieser Standard wurde in 2 µm dicken Schnitten mit auf dem Objektträger exponiert (siehe Abb. 1)).

Da die Tritiumaktivität im einzelnen Nervenschnitt teilweise unterhalb einer szintillatorischen Erfaßbarkeit lag, wurden jeweils 100 µm lange Zylinder der Nervi optici zur Ermittlung der Quellaktivität verwandt. Jeweils 5 Nervenschnitte der Dicke 2o µm wurden mit 1 Milliliter Xylol versetzt und 24 Stunden geschüttelt, anschließend mit 10 Milliliter UNISOLVE beschickt. Zur Ermittlung der Zählausbeute wurde in jeder Serie ein interner Tritiumstandard mitgeführt. Jede Probe wurde insgesamt 3 x 20 Minuten gezählt, um die vor allem im niedrigen Zählbereich störenden Background-Impulse besser erfassen zu können.

Korrespondierende Schnitte zu den szintillatorisch ausgewerteten Nervenschnitten wurden planimetrisch erfasst. Die Aussparung von Gefäßen erlaubt eine exakte Bestimmung der Schnittfläche. Da die Länge der Nervenzylinder (100 µm) bekannt ist, kann das Gewebevolumen ermittelt werden. Die genaue Kenntnis des Volumens und das zugehörige Messergebnis der Szintillation erlauben die Berechnung der inkorporierten Aktivitätsmenge pro 100 μm^3.

2.1 Aufnahme der Meßwerte

Die Meßvorrichtung besteht aus einem Mikroskop-photometer der Fa. LEITZ (MPV-1 mit einem Photo-multiplier, Typ S 20; siehe Abbildung 2)) mit einer variablen Meßblende und der Möglichkeit, das Meßfeld in das Sehfeld einzublenden. Die Messungen erfolgten im Auflicht. Durchlichtmessungen, d.h. densitometrische Bestimmungen der Silberkorndichten sind aufgrund der morpholigischen Schnittstrukturen unmöglich, da z.B. Nucleolus oder Karyoplasma unterschiedliche Lichtabsorptionen bewirken.
Zur Kontrolle der Spannungsversorgung von Lampe und Photomultiplier dient ein Spannungskonstanthalter der Fa. KNOTT. Die von der Photodiode über einem Meßfeld von 100 μm^2 registrierte Lichtmenge wird mit den zugehörigen Ortskoordinaten digital angezeit und auf einem Datarecorder der Fa. MDS zur weiteren Verarbeitung im Rechenzentrum der Universität abgespeichert. Eine im Impulsgeber eingebaute Codiertaste erlaubt die Markierung artefizieller oder besonders interessierender Schnittbereiche.

Mit Hilfe der obigen Auswerteeinrichtung wurden die Reflexionsmeßwerte, d.h. die aktuellen Silberkorndichten gleicher Nervenschnitte zu verschiedenen Zeiten aufgenommen.

Siehe Abbildung 2), Seite 9

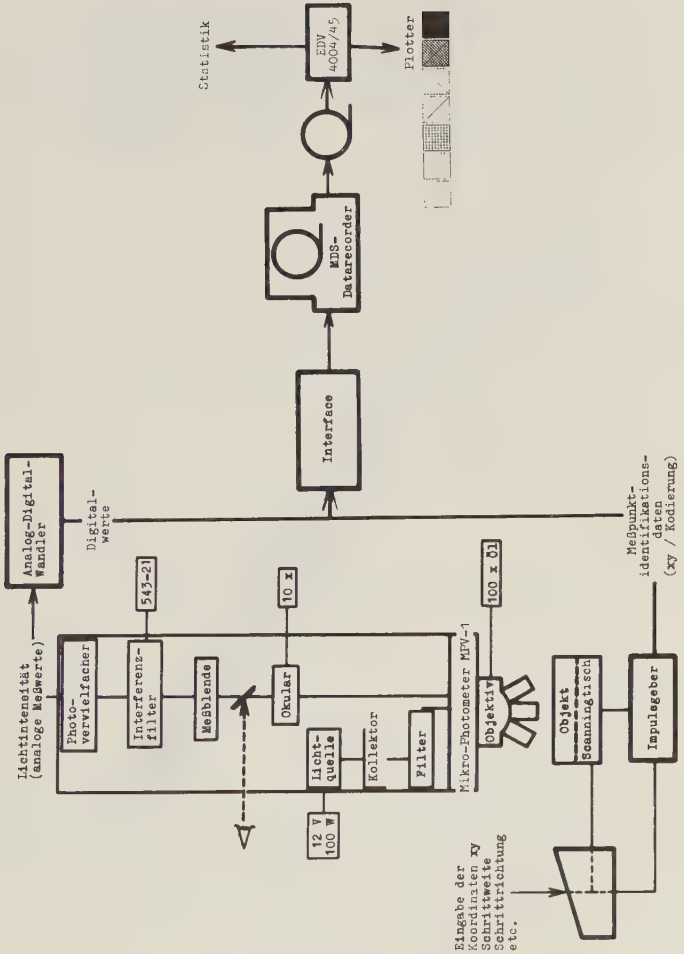


ABBILDUNG 2)

Diagramm der Auswerteeinrichtung

Erläuterungen siehe Text

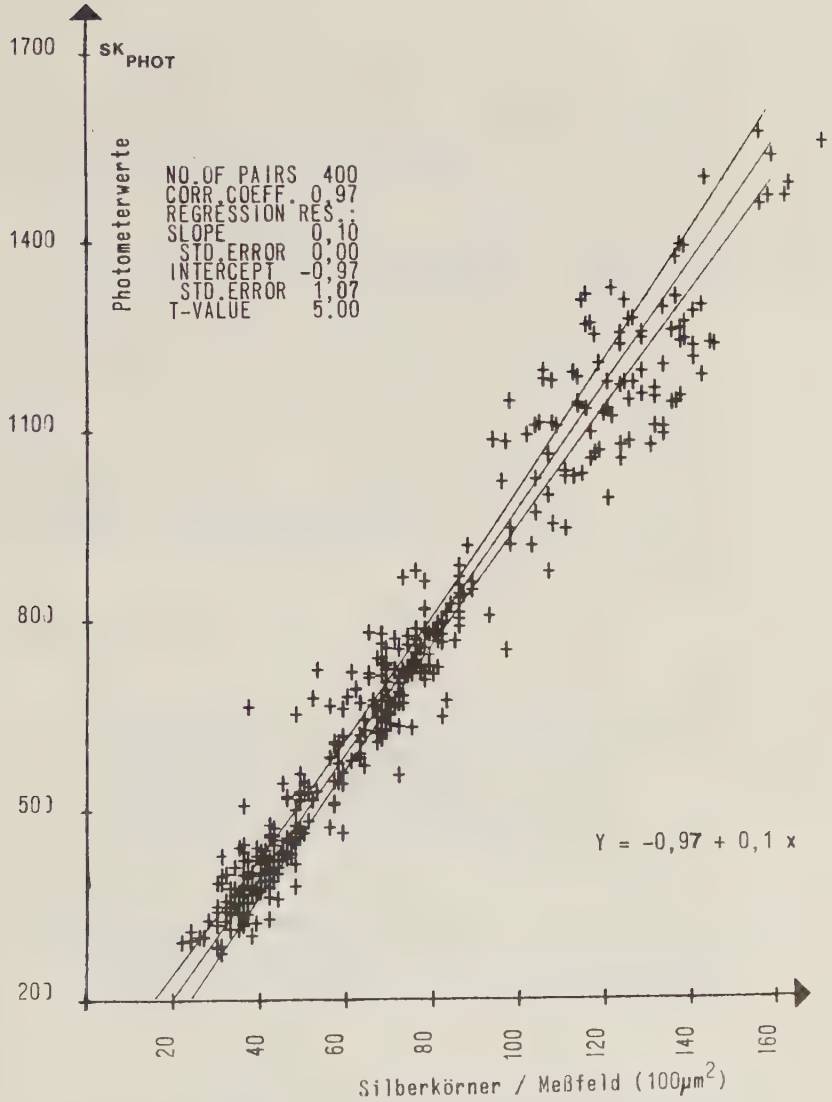
2.2 Auswertung

Ziel der Auswertung ist die Erstellung eines mathematischen Modells, das eine Zuordnung inkorporierter Radioaktivitätsmengen zu Photometermesswerten in Abhängigkeit von der Expositionszeit T gestattet.

$$sk_{phot} = f\ (T,\ ß)$$

Im niedrigen Silberkornbereich, d.h. weniger als 200 Silberkörner pro 100 μm^2, konnte die von DOERMER postulierte Linearität zwischen Silberkornzahl und Photometermesswert bestätigt werden. Über 5000 Messfeldern der Größe 100 μm^2 wurden die visuell ermittelten Silberkorndichten und die zugehörigen Photometermesswerte miteinander korreliert.

Siehe Abbildung 3), Seite 11



ABBILDUND 3)

Photometermesswerte (Sk_{PHOT}) als Funktion der visuell ermittelten Silberkorndichten

Abb. 3) zeigt die in diesem Kurvenbereich gute lineare Korrelation.

Bei den übrigen Standardpräparaten wurden die Photometermesswerte als Funktion der Zeit T und der nun nicht mehr numerisch erfassbaren Silberkornzahl aufgetragen.
Aus der mathematischen Beziehung

$$Sk_{phot} = f\ (SK_{num})$$

wurde so eine Beziehung

$$Sk_{phot} = f\ (T, ß)$$

T entspricht hier der Expositionszeit und ß repräsentiert die Anzahl der beta-Partikel über der Schnittoberfläche.

Da nach Angabe der Fa. AMERSHAM-BUCHLER pro Minute 4000 beta-Partikel pro Quadratzentimeter über der Oberfläche des Methacrylatsstandards mit der Photoemulsion wechselwirken, kann zum jeweiligen Zeitpunkt T eine exakte mathematische Beziehung zwischen der Anzahl der Silberkörner und der zu ihrer Generierung benötigten beta-Partikeln erstellt werden.

Die in Abb. 3) gezeigte lineare Korrelation zwischen Photometermesswert und der Anzahl der Silberkörner folgt in diesem linearen Kurventeil der Funktion:

$$Sk_{num} = -0.97 + 0.1\ Sk_{phot}$$

Über der Oberfläche eines 100 μm^2 großen Standardausschnittes können pro Woche 40.32 beta-Partikel mit der Photoemulsion wechselwirken. Nach vier Wochen

findet sich über dem Standard eine Photometermesswert von 400. Dies entspricht nach der obigen Gleichung einer effektiven Silberkornzahl von 39 über dem Messareal von 100 μm^2.

Andererseits folgt aus dieser Expositionszeit, daß 161 beta-Partikel in der Photoemulsion wechselwirken. Es wurden somit durchschnittlich 4,13 beta-Partikel für die Generierung eines Silberkorns benötigt. Nach 14 Wochen steigt diese Zahl auf 4,7 beta-Partikel. Der so erfaßbare mathematische Zusammenhang zwischen beta-Partikeln in der Photoemulsion und der hieraus resultierenden Anzahl der Silberkörner erlaubt die Kontrolle des Entwicklungsvorganges und eine Korrektur falsch entwickelter Präparate.

Siehe Abbildung 4), Seite 14

Abbildung 4) zeigt, daß bei der in dieser Arbeit gewählten Emulsions (NTB2)-Entwickler (DEKTOL)-Kombination die Entwicklungszeit von 2,5 min. im optimalen Bereich liegt. Nach Angaben von NEELY und COMBS (1976) wird in diesem Entwicklungszeitraum das Photometersignal nicht durch störende background-Entwicklung verfälscht.

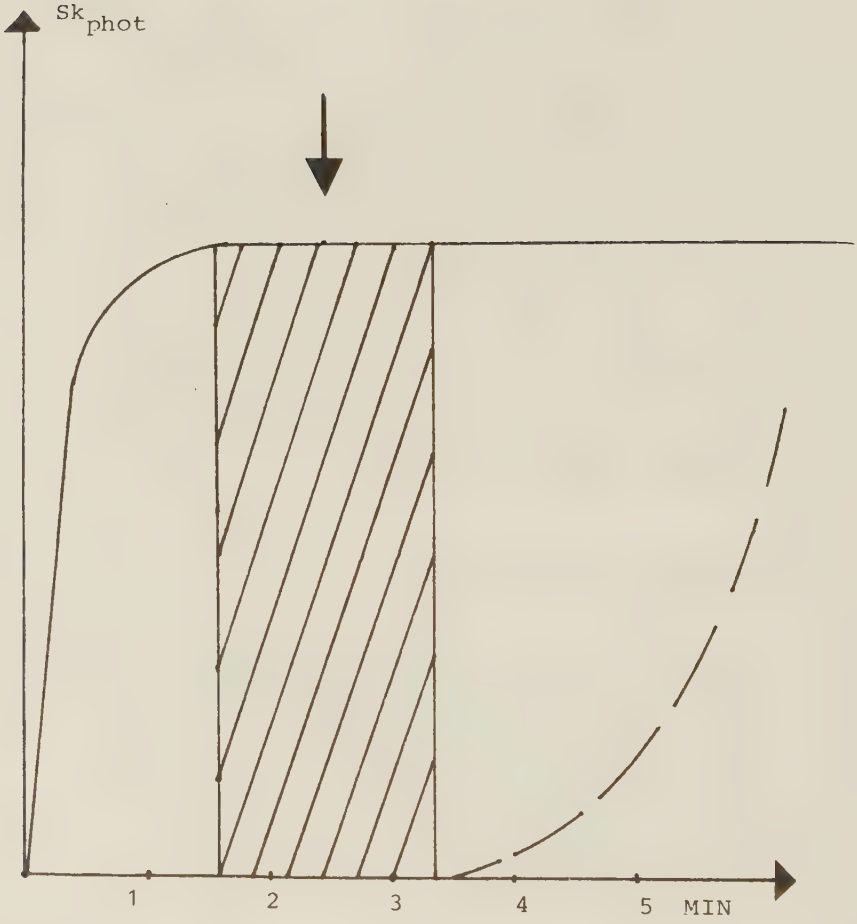


ABBILDUNG 4)

→ gewählter Entwicklungszeitpunkt

– – – Background

——— Photometersignal der belichteten Emulsion

Sk_{phot} = Photometermesswert

(NEELY,J.E.;COMBS,J.W.,1976)

3. Ergebnisse

Über den zwischen 1 und 28 Wochen exponierten Nervenschnitten und den zugehörigen Standardpräparaten werden die zugehörigen Photometermesswerte aufgenommen. Es wurden pro Nervenanschnitt und Zeitpunkt T mindestens 100 Messfelder ausgemessen. Somit wurde jede Kurve in Abbildung 5) aus mindestens 1300 Messwerten erstellt. Zum Ausschluß artefizieller Messdaten (Gefäße etc.) erfolgten alle Messungen unter visueller Kontrolle.

Die Anzahl der Messwerte, ihre Standardabweichung und der zugehörige Mittelwert zu jedem Zeitpunkt T wurden im Rechenzentrum der Universität auf einer Tr 445 zur Approximation einer Funktion eingegeben. Die beste Approximation gewährleistete die Funktion

$$SK_{phot} = A\ (1 - e^{-BT})$$

SK_{phot}	=	Photometermesswert
A	=	maximales Photometersignal
T	=	Expositionszeit
B	=	Proportionalitätsfaktor

Nervenanschnitte mit identischem Kurvenverlauf wurden zur Erstellung der Abb. 5) zusammengefaßt. Diese Abbildung zeigt sowohl die lineare Abhängigkeit im Bereich niederer Silberkornzahlen, als auch die exponentielle im Bereich höherer Silberkorndichten.

Um jedem Graphen eine definierte Quellaktivität zuzuordnen, wurden die entsprechenden Nervi optici szintillatorisch ausgewertet (siehe Seite 6).

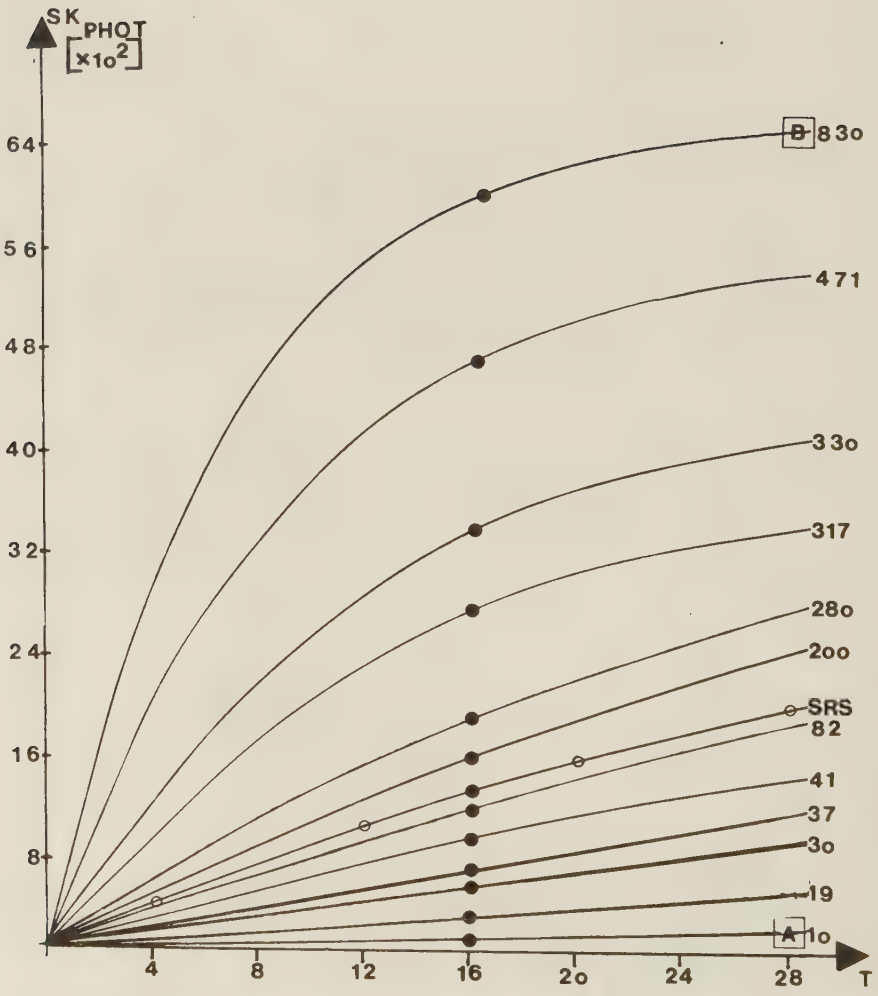


ABBILDUNG 5)

Photometermesswerte (Sk_{PHOT}) als Funktion der Expositionszeit. Parameter der Kurvenschar ist die inkorporierte Radioaktivität (Angaben in µBq pro 100 μm^3)

T = Expositionszeit in Wochen

Sk_{PHOT} = Photometermesswerte (x 10^2)

SRS = Standardreferenzquelle (142 µBq pro 100 μm^3)

Die mit -●- markierten Punkte dienen zur Erstellung der Korrekturfunktion (siehe Text, Seite 17)

In der Abbildung 5) erlauben Photometermesswert und zugehöriger Zeitpunkt T die Zuordnung zu einer definierten Quellaktivität.

Während die Photometermesswerte nach einer Expositionszeit von 28 Wochen bei den Graphen A und B ein Verhältnis von 1 : 16 zeigen, ändert sich dieses Ergebnis bei der Betrachtung der inkorporierten Radioaktivität um ca. 400 %.

Photometermesswerte, die nicht genau auf einer der obigen Kurve liegen, können mit Hilfe einer Newtonschen Näherung einer Quellaktivität zugeordnet werden.
Der durch eine solche Näherung bedingte Fehler ist vernachlässigbar in Anbetracht des auftretenden Gesamtfehlers bei alleinigem Vergleich zweier Photometermesswerte.

Ein Beispiel einer rechnergestützten automatischen Auswertung von Autoradiogrammen zeigen die Abbildungen 6) und 7). Um eine deutlichere Darstellung zu erreichen, wurden die korrigierten Photometermesswerte (= inkorporierten Radioaktivitäten) mit dem Faktor 10 multipliziert.
Abbildung 6) zeigt im Teil a) den nicht korrigierten zweidimensionalen Plot eines Hirnschnittes, der 16 Wochen exponiert wurde.
Aus den Kurven der Abbildung 5) wurde mit Hilfe der TR 445 eine Näherungsfunktion angeglichen (siehe Abbildung 5) -●-) und die Wertematrix der Photometermesswerte im Rechner mit Hilfe dieser Funktion korrigiert.
Abbildung 6b) zeigt den korrigierten zweidimensionalen Plot.

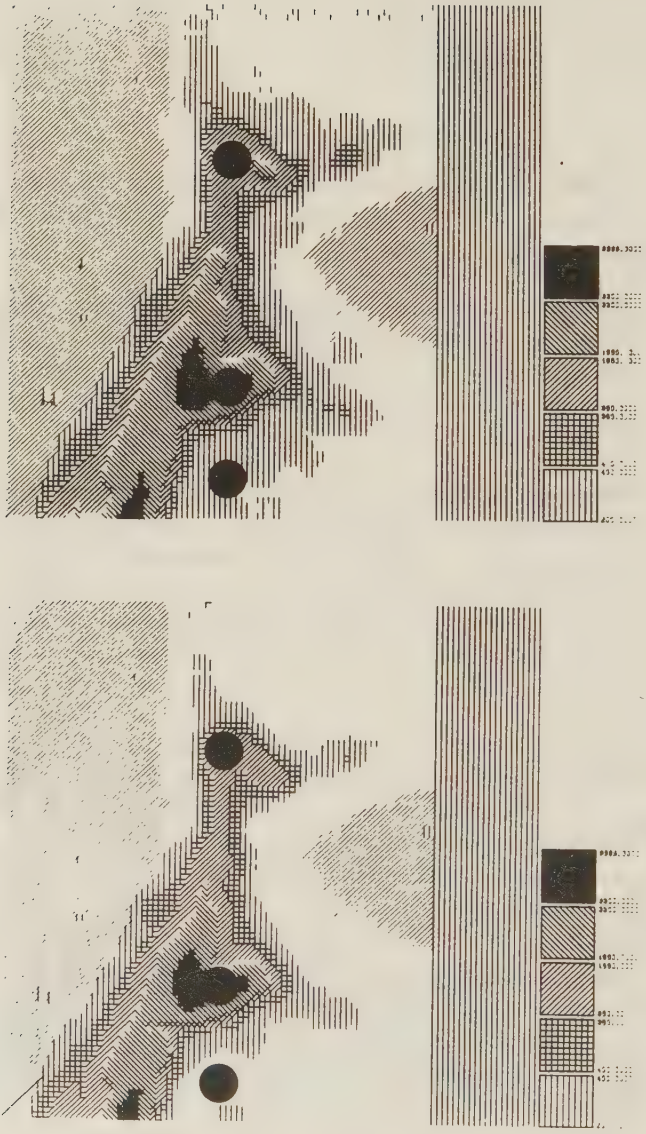


ABBILDUNG 6)

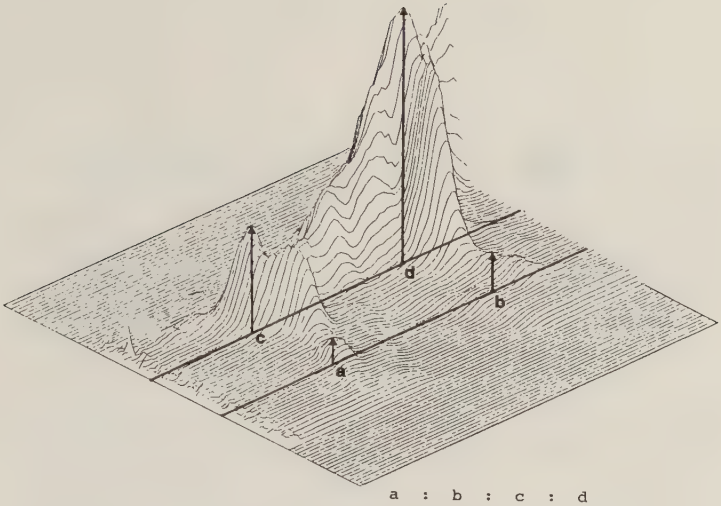
a) Plot der Originalmatrix

b) Plot der korrigierten Matrix

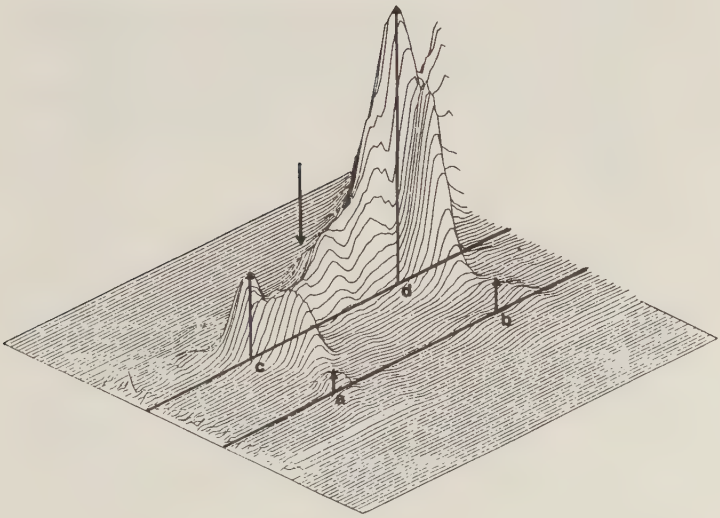
Verhältnis der Messwerte an den mit ● markierten Koordinaten (Mittelwerte aus 4 Messwerten)

a) 1:12:38

b) 1:15:89



a : b : c : d
1 : 1,4 : 3,8 : 9,1



a : b : c : d
1 : 1,6 : 4,2 : 14

ABBILDUNG 7)

a) Dreidimensionale Darstellung der Originalmatrix

b) Dreidimensionale Darstellung der korrigierten Matrix

Erklärungen siehe Text Seite 20)

An den mit -●- markierten Koordinaten wurden die Mittelwerte aus vier benachbarten Messwerten miteinander verglichen.
Während die unkorrigierte Matrix der Photometermesswerte an diesen Koordinaten ein Verhältnis von 1 : 12 : 38 zeigt, ändert sich die Relation um über 100 % bei der auf inkorporierte Radioaktivitäten korrigierten Matrix (1 : 15 : 89).
Abbildung 7) zeigt die dreidimensionale Darstellung der Wertematrizes. Bei den hier gezeichneten Vektoren, die höhere Photometermesswerte miteinander vergleichen, beträgt der Fehler bei Nichtbeachtung der korrigierten Matrix ca. 50 %.
In Abbildung 7b) ist der aufgrund der Korrekturmatrix im niedrigen Wertebereich verlangsamte Anstieg des Maximums mit einem Pfeil gekennzeichnet.Höher markierte Areale werden durch die korrigierte Matrix schärfer diskriminiert.

4. Diskussion

1957 schrieb Hilde Levi, daß der Ausdruck 'quantitativ' in fast keiner analytischen Methode so fehl am Platze sei wie in der Autoradiographie. Auch heute wird der Begriff 'quantitative Autoradiographie' allgemein für den Vergleich letztlich nur 'qualitativer Daten' und Silberkorndichten verwandt. Nur selten wird unter dem Begriff quantitativ ein Absolutgehalt inkorporierter Radioaktivität, d.h. eine physikalische Größe verstanden.

Die Gründe für die von vielen Autoren vertretene pessimistische Einschätzung liegen in der großen Fehlerhäufigkeit der Autoradiographie. Allen Experimenten ist hier die Ausnutzung der ionisierenden Fähigkeit radioaktiver Strahlung gemeinsam. Gammastrahlung, die auf eine direkte Ionisation nicht angewiesen wäre, kommt aufgrund des geringen Auflösungsvermögens für die Autoradiographie nicht in Frage. Alpha-Strahler können aufgrund ihrer hohen Ionisationsfähigkeit und der hieraus resultierenden geringen Reichweite ebenfalls nicht genutzt werden.

Die in der Autoradiographie am besten zu nutzenden Strahler sind beta-Strahler. Darunter werden beta-Strahler mit einer geringeren Energie bevorzugt, da sie eine höhere Auflösung gewährleisten.

Ihr Nachweis erfolgt überwiegend durch die Bildung von Silberkörnern aus Silberhalogenid-Komplexen. Diese Silberhalogenid-Komplexe können sowohl als flüssige Emulsion - Dipping - als auch als feste Emulsion - Stripping Film - mit dem zu untersuchenden Material in Kontakt gebracht werden.

Unvermeidbar sind in der experimentellen Autoradiographie folgende Hauptfehlermöglichkeiten:

4.1 Fading

Fading bedeutet das Verschwinden eines latenten Bildes während der Expositionszeit. Normalerweise wird Ionisationsenergie durch die Kernstrahlung auf den Silberhalogenidkristall übertragen. Das so entstandene latente Bild wird bei der Entwicklung in ein Silberkorn überführt.

Während das Fading in der Stripping-Film-Technik eine große Rolle spielt, zeigten autoradiographische Experimente mit der Dipping-Technik ein vernachlässigbares Fading (KOPRIWA und LEBLONC, 1962; APPLETON, 1966; PELC, 1965).

Im Widerspruch hierzu stehen Experimente von OJA (1966) und BASERGA (1967), die ein Fading beobachten konnten.

Fading kann Fehler verursachen, wenn aufgrund der Silberkornanzahl eine quantitative Aussage getroffen werden soll und verschiedene Proben nach unterschiedlich langen Expositionszeiten miteinander verglichen werden sollen. ROGERS (1967) schlug deshalb die Verwendung lichtexponierter Präparate zur Kontrolle vor. Stellt man bei diesen Präparaten kein Verschwinden von Silberkörnern fest, ist das Fading insgesamt vernachlässigbar.

Eine weitere Möglichkeit, den Faktor Fading in der quantitativen Autoradiographie exakt zu berücksichtigen, ist die in dieser Arbeit gewählte Möglichkeit,

einen Standard bekannter Radioaktivität bis zu jedem Entwicklungszeitpunkt T mitzuführen.

Eine mathematische Erfassung des Fehlers ist prinzipiell unmöglich, da ein Fading nicht unbedingt auftreten muß.

4.2 Geometrische Fehler

DÖRMER und BRINKMANN (1972) konnten zeigen, daß die Prozentzahl der Silberkörner, die einer exakt zu definierenden radioaktiven Quelle zuzuordnen sind, vom Durchmesser dieser Quelle abhängen.

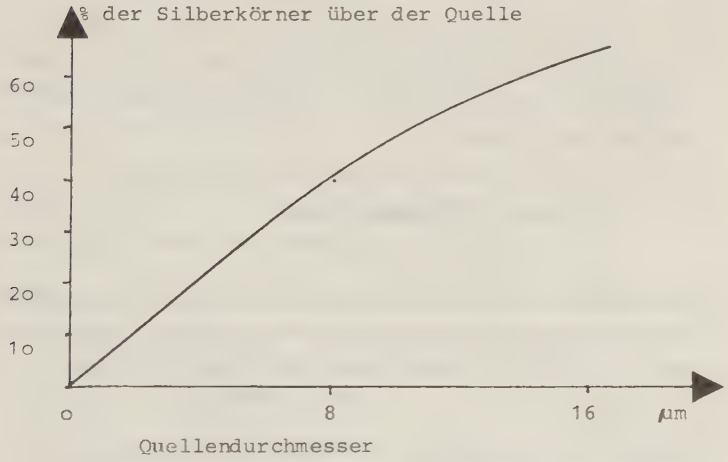


ABBILDUNG 8)
Prozentualer Silberkornanteil in Abhängigkeit von der Quellengröße

(DÖRMER,1972)

Abbildung 8)zeigt den prozentualen Anteil der Silberkörner in Abhängigkeit vom Durchmesser der Quelle.

Es gibt viele Versuche, sowohl theoretischer als auch praktischer Art, das geometrische Problem zu lösen (BLACKETT et al., 1959; HERRMANN et al., 1961). Die Ergebnisse bleiben jedoch alle unbefriedigend, da die hier verwendeten beta-Strahler aufgrund ihrer hohen Energien eine genaue Kenntnis der Emulsionsdicke voraussetzen.

Anders liegen die Verhältnisse bei der Verwendung von Tritium, da aufgrund der geringen Energie von 18 KeV die Emulsionsdicke als unendlich angesetzt werden kann.

Nach DONIACH und PELC (1950) gibt es drei entscheidende Punkte, die die Ausdehnung des autoradiographischen Bildes über einer singulären Quelle beeinflussen:

1) der Abstand zwischen Film und Probe
2) Dicke der Kernemulsion
3) Ausdehnung der radioaktiven Probe

Da in dieser Arbeit die Dippingmethode verwandt wurde, kann der erste Punkt vernachlässigt werden. Die Dicke der verwendeten Kernemulsion (ca. 5 µm) kann für Tritium als unendlich angesehen werden.

Da die Nervi optici von 40 Ratten des gleichen Stammes (Hn Wistar-II) als homologes Untersuchungsmaterial anzusehen sind (DE JUAN et al., 1978), wird der geometrische Fehler durch die Ausdehnung der radioaktiven Quellen durch das mathematische Modell hinreichend berücksichtigt.

Die von DÖRMER und BRINKMANN (1972) angegebene mathematische Näherungsformel, die den Anteil der Silberkörner in Abhängigkeit vom Probendurchmesser d angibt

$$f = 1-e^{-ad}$$

diente als Ausgangspunkt des in dieser Arbeit entwickelten mathematischen Modells.

4.3 Rückwärtsstreuung (backward-scattering)

Bedingt durch die Wahrscheinlichkeit des radioaktiven Zerfalls werden nur 50 % der entstehenden beta-Teilchen in Richtung Photoemulsion emittiert. Zusätzlich zu diesen besteht jedoch die Möglichkeit, daß beta-Partikel, die aus einer dünnen Probe stammen, vom Objektträger reflektiert werden und mit der Photoemulsion wechselwirken.

Nach Untersuchungen von YANKWICH und WEIGL (1948) und ODEBLAD (1952) kann dieser Anteil bis zu 17 % betragen.

GLEDENIN und SOLOMON (1950) sowie EVANS (1962) bestätigten die physikalische Theorie, daß diese Reflexion mit dem Atomgewicht der rückstrahlenden Substanz wächst.

Dieser Fehler spielt bei dem in dieser Arbeit entwickelten Modell keine Rolle, da für die Tritium-autoradiographie die verwendeten Schnittdicken als unendlich zu betrachten sind.

4.4 Chemographie

BOYD (1955) prägte diesen Begriff für alle Eigenschaften der zu untersuchenden Probe, die die Emulsion chemisch beeinflussen können. Er unterscheidet eine negative Chemographie, d.h. ein Verschwinden des latenten Bildes (siehe Fading) und eine positive Chemographie, d.h. das Entstehen von Silberkörnern nicht durch die Ionisationsenergie der radioaktiven Strahlung, sondern durch chemische Energie.

Bei der Verwendung von AR 10 Stripping Film konnte dieser Effekt von DÖRMER und BRINKMANN (1972) an Zellausstrichpräparaten gezeigt werden.

Ein Beispiel negativer Chemographie zeigen ROGERS und JOHN (1969), die eine belichtete Emulsion auf Schnitten der Submandibulardrüse der Ratte unterschiedliche Zeit bei differenten Temperaturen exponierten. Sie konnten zeigen, daß eine negative Chemographie mit sinkenden Temperaturen signifikant abnimmt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Schnitte wurden deshalb bei einer konstanten Temperatur von 4° C gelagert.

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluß chemographischer Effekte zu verkleinern, ist der Verzicht auf eine Färbung des Präparates vor der Exposition. Während eine negative Chemographie vorwiegend bei unfixierten Materialien (z.B. Gefriertrocknung) auftritt, zeigen Färbematerialien überwiegend positive Effekte.

DEUCHAR (1962) zeigte dies für Celestin-blau, STÖSKER und MÜLLER (1967) für Orcein.

In dieser Arbeit wurde auf eine Färbung der Präparate aus den oben angeführten Gründen verzichtet.

Bei einer quantitativen Autoradiographie sollte bei der Verwendung gefärbter Materialien der von ROGERS (1967) gemachte Vorschlag berücksichtigt werden, ein lichtexponiertes Referenzpräparat mitzuführen. Schwierig kann eine Differenzierung zwischen positiver Chemographie und Auswirkungen der Backgroundstrahlung werden.

4.5 Background

Wenn eine Emulsion keine Silberkörner nach einer Exposition erkennen läßt, muß ein Fading vermutet werden, da eine Backgroundstrahlung überall vorhanden ist. Dieses Backgroundproblem wird dann wichtig, wenn die niedrigste Silberkorndichte, die auszuwerten ist, im Bereich der durch eine maximale Backgroundstrahlung erzielbaren liegt. Bei einer visuellen oder automatischen Erfassung niederer Silberkorndichten ist dies zwangsläufig immer relevant. STILLSTRÖM (1963, 1965) gibt folgende Gleichung für eine Backgroundkorrektur an:

$$pl = (pm-pk)/(1-pk)$$

pl = Prozentsatz der Zellen, die wirklich radioaktives Material enthalten
pk = Prozentsatz der Zellen, die nicht radioaktiv markiert sind, aber trotzdem Silberkörnern zugeordnet werden können
pm = Gesamtheit aller Zellen, die zur Generierung von Silberkörnern beitragen.

MOFFART (1971) schlägt die Verwendung eines Rechners vor, der durch ein Programm eine automatische Korrektur der Silberkorndichten vornimmt.

Die eleganteste Lösung des Backgroundproblems ist die Verlängerung der Expositionszeit. In der vorliegenden Arbeit wurden so lange Expositionszeiten gewählt, daß eine Unterscheidung Signal-Background möglich wird. Dieses Vorgehen bedingt jedoch eine photometrische Auswertung der Autoradiogramme, da die Bestimmung der Anzahl der Silberkörner visuell oder durch automatische Einzelkornzählung unmöglich wird.

4.6 ß-Absorption

Der bei der Verwendung von beta-Strahlern in der quantitativen Autoradiographie mit Abstand gravierendste Fehler ist die Absorption der beta-Strahlung.

Beim Durchgang radioaktiver Strahlung durch Materie tritt im allgemeinen eine exponentielle Schwächung auf. Während Gamma-Strahlung durch einen additiven Effekt von Compton-Streuung, Paarbildung und Ionisationsverlusten durch den Photoeffekt absorbiert wird, steht im Vordergrund der Absorption von beta-Strahlung die Ionisation.

Nach EVANS (1962) besteht ein exponentieller Zusammenhang zwischen der Anzahl der absorbierten beta-Partikel und der Dicke der Absorberschicht.

$$n = n_o \, e^{-ad}$$

n = Anzahl der beta-Partikel nach Absorption
n_o = ursprüngliche Anzahl der beta-Partikel
d = Dicke des Absorbers
a = materialspezifischer Absorptionskoeffizient

In der Autoradiographie werden zwei Begriffe der beta-Absorption unterschieden.

Der Begriff einer beta-Selbstabsorption wird dann benutzt, wenn die beta-Partikel in der radioaktiven Quelle, z.B. einem Tritium dotierten Nucleolus absorbiert werden. Bei einer Absorption im nicht radioaktiven Material spricht man von einer beta-Absorption.

Beide Arten der Absorption bilden die signifikanteste Fehlermöglichkeit einer quantitativen Autoradiographie, besonders bei der Verwendung Tritium markierter Substanzen, da deren maximale Strahlungsenergie 18 KeV beträgt. Es gibt in der autoradiographischen Literatur viele Autoren, die sich mit diesem Thema beschäftigt haben. Z.B. FITZGERALD et al. (1951), CLEMMONS (1957), LAJTHA und OLIVER (1959), FALK und KING (1963), PERRY (1964), MAURER und PRIMBSCH (1964), SCHULTZE und MAURER (1963).

Siehe Abbildung 9), Seite 30

Abbildung 9) zeigt das Verhältnis Schnittdicke und Silberkorn unter Berücksichtigung der beta-Selbstabsorption in verschiedenen Zellstrukturen. Während die Geraden die Verteilung der Silberkörner ohne eine Berücksichtigung der Absorption zeigen, zeigen die experimentellen Ergebnisse in den Kurven a), b) und c), daß bei einer Schnittdicke größer als 3 µm die Silberkornverteilung stagniert.

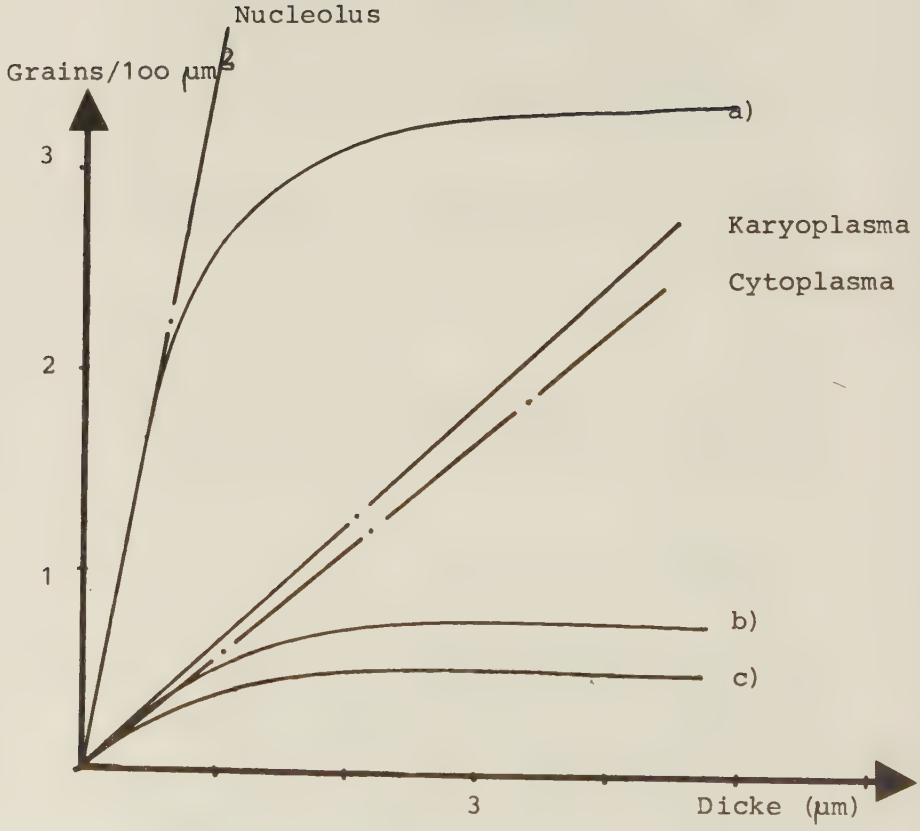


ABBILDUNG 9)
Anzahl der Silberkörner (Grains/100 μm^2) unter Berücksichtigung der beta-Selbstabsorption in verschiedenen Zellstrukturen. (MAURER und PRIMBSCH, 1964)

Den besten Einblick in die Problematik der beta-Absorption gibt die Arbeit von MAURER und PRIMBSCH (1964). Experimentell wurden die unterschiedlichen Absorptionsverhältnisse im Karyoplasma, Cytoplasma und Nucleolus einer Zelle quantitativ erfaßt. Nach Auszählung der verschiedenen Kornzahlen enthielt der Nucleolus o h n e Berücksichtigung der beta-Absorption 25 % der Aktivität und das verbleibende Karyoplasma 75 %. Nach Korrektur des durch die Selbstabsorption gegebenen Fehlers enthält der Nucleolus 65 % und das Karyoplasma nur 35 % (MAURER und SCHULTZE, 1963). Weiterhin zeigten MAURER und PRIMBSCH (1964), daß eine nur 0,5 µm dicke Serumschicht über einem Kernlabel zu einer beta-Absorption von 50 % führt. Diese beta-Absorption ist eine Funktion der Massenbelegungsdichte. MAURER und SCHULTZE (1969) untersuchten diesen Effekt und verglichen ihre Daten mit denen von FITZGERALD (1951), PELC und WELTON (1967). Übereinstimmend kommen sie zu dem Ergebnis, daß eine 50 %-ige beta-Absorption schon bei einer Massenbelegungsdichte von 0.05 mg/cm^2 auftritt. Die Größe der beta-Selbstabsorption beträgt ca. 70 % bei einer Massenbelegungsdichte von 0.1 mg/cm^2. Dieser Massenbelegungsdichte entspricht ungefähr 5 µm Karyoplasma, 3.5 µm Cytoplasma oder 1 µm Nucleolus. Aufgrund dieser Untersuchungen fordern diese Autoren eine effektiv unendliche Dicke histologischer Präparate für die quantitative Autoradiographie.

Nach den oben angeführten Ergebnissen ist diese Bedingung in der Tritiumautoradiographie bei Schnitten mit einer Dicke größer als drei µm erfüllt.

(Siehe Abbildung 9).

Die in vorliegender Arbeit verwendeten Nervenquerschnitte wurden aus diesen Gründen 5 µm dick geschnitten. Nur so konnte gewährleistet werden, daß die Silberkorndichte ein Maß für die inkorporierte Radioaktivität ist. Ein weiteres Kriterium ist der Trocknungszustand des Gewebes. GATZKE und JENNISSEN (1975) konnten zeigen, daß die beta-Absorption von 23 % auf 65 % zunimmt, wenn die zu untersuchenden Gewebe feucht sind. Feuchtigkeit führt außerdem nach NIKLAS und MAURER (1955) zu einem vermehrten Fading.

Aufgrund dieser Untersuchungen wurde jedem Exponat ein Trockenmittel zugesetzt.

DÖRMER und BRINKMANN (1972) geben einen funktionellen Zusammenhang zwischen Trockenmasse und gemessener Aktivität an. In einer 1968 von DÖRMER et al. durchgeführten Untersuchung wurde zuerst das Trockengewicht der zu untersuchenden Substanz bestimmt, dann die Anzahl der Silberkörner. Aufgrund der obigen Überlegung konnten diese Ergebnisse um den Faktor der Selbstabsorption korrigiert werden. Dieses ist ein sehr zeitaufwendiges Verfahren und sowohl in der Bestimmung der Trockenmassenbelegungsdichte als auch in der Bestimmung der beta-Selbstabsorption mit einer sehr großen Fehlerbreite behaftet. Ein einfaches Verfahren zur Umgehung der durch die beta-Selbstabsorption entstehenden Probleme wäre die Verwendung eines höher energetischen beta-Strahlers, z.B. Kohlenstoff-14. Dieser Stoff hat in der Autoradiographie jedoch entscheidende Nachteile. Nach den oben ausgeführten Überlegungen verlangt dieses

Vorgehen eine Sättigungsdicke von 3 - 4 mg/cm^2, d.h. eine Schnittdicke von ca. 30 µm. Damit würde eine zelluläre Zuordnung fast unmöglich, außerdem ist der geometrische Fehler erheblich größer als in der Tritiumautoradiographie.

Bei dem in dieser Arbeit entwickelten Modell ist eine genaue Kenntnis der beta-Absorption nicht notwendig, da die zur Ermittlung der inkorporierten Radioaktivität gewonnenen Funktionen empirisch bestimmt wurden und somit alle experimentellen Fehlermöglichkeiten der quantitativen Tritiumautoradiographie berücksichtigen. Dies gilt auch für die vor allem bei langen Expositionszeiten und hohen Silberkorndichten auftretende Koinzidenz. Unter diesem Begriff versteht man das Auftreffen mehrerer beta-Partikel auf den gleichen Silberhalogenidkomplex. Im hier vorgestellten mathematischen Modell wird dieses Verhalten im Sättigungsterm A berücksichtigt.

4.7 Quantitative Auswertemöglichkeiten

Allen bisher in der quantitativen Autoradiographie üblichen Auswerteverfahren liegt die Bildung von Silberkörnern aus Silberhalogenidkomplexen zugrunde. Der digitale Charakter der Silberkörner wird jedoch in zwei unterschiedlichen Arten ausgenutzt.

4.7.1 ß-track-counting

Nach einer von ROGERS (1967) gegebenen Definition bilden vier oder mehr in einer Linie liegende Silberkörner eine beta-track. Da beta-Partikel Kernelektronen sind, die eine kleine Ruhemasse haben und so zahlreiche elastische Stöße im Material und auch in der Photoemulsion (rho = 6.75 g/cm^3) erleiden, ändert sich ihr Weg häufig, so daß selbst bei relativ niederenergetischen beta-Strahlern, z.B. Kohlenstoff-14 nur selten exakt gerade Bahnen zustande kommen.

EVANS (1962) konnte zeigen, daß bei einer kinetischen Energie der beta-Partikel, die kleiner ist als 1 MeV der Energieverlust durch Ionisation stark zunimmt. Die umgekehrt proportional zur kinetischen Energie zunehmende Ionisationsfähigkeit bedingt den kleiner werdenden Abstand zweier benachbarter Silberkörner am Ende einer Emulsionsspur.

Mit der Empfindlichkeit der Photoemulsion und ihrer Verwertbarkeit für eine beta-track-Autoradiographie beschäftigten sich ZAJAC und ROSS (1949), LEVI und HOGBEN (1955) sowie LEVI, ROGERS et al.(1963).

LEVINTHAL und THOMAS (1957) bestimmten mit Hilfe der beta-track-Autoradiographie den Phosphorgehalt in der DNA von Bacteriophagen. Sie suspendierten die Phagen in der Photoemulsion (ILFORD G5). Drei günstige Voraussetzungen kamen ihnen hierbei zugute:

1. Sie konnten von der Annahme ausgehen, daß der Phosphorgehalt aller Phagen gleich groß ist.
2. Das Volumen der Phagen ist kleiner als 1 μm^3.
3. Die DNA ist unlöslich in der Emulsion.

Der von ihnen genutzte beta-Strahler hat die mittlere Energie von 680 KeV. Aufgrund dieser hohen Energie sind zu beobachtende Spuren geradlinig, der Abstand der einzelnen Silberkörner genügend groß. Durch eine ausreichende Verdünnung konnten Interferenzen mehrerer Strahlungsquellen vermieden werden. Sie konnten zeigen, daß ihre nachweisbaren tracks bis zu 100 % der Zerfälle repräsentieren. Durch Variation der Expositionszeit, der Kenntnis der Halbwertszeit von Phosphor-32 und der Beachtung einiger Randbedingungen (d.h. Entstehung einer Spur im maximalen Abstand von 2 µm von der Quelle, Strahlungsquellen mit weniger als 5 tracks bleiben unberücksichtigt - mathematische Korrektur -) konnten sie N_o, d.h. die ursprüngliche Anzahl der Phosphoratome ermitteln.

LEVI et al. (1963) bestimmten die Länge der beta-tracks verschiedener radioaktiver Quellen in ILFORD G5 Emulsion und fanden folgende mathematische Beziehung für die Anzahl der Silberkörner:

$$\lg SK_{num} = 1.19 \lg E - 0.74$$

E = Energie des beta-Strahlers
SK = Anzahl der Silberkörner

Für die Länge der beta-tracks fanden sie folgenden empirischen Zusammenhang:

$$\lg L = 1.59 \lg E - 1.51$$

L = Länge der tracks
E = Energie des beta-Strahlers.

Nach ROGERS (1967) folgt hieraus eine Emulsionsdicke von 15 - 20 µm für Kohlenstoff-14 und Schwefel-35, während sie bei der Verwendung von Phosphor-32 60 µm betragen müßte. Die Verwendung solch dicker Emulsionen bedeutet eine beträchtliche Einschränkung des Auflösungsvermögens. Außerdem können Interferenzen der Strahlungsquellen bei der Untersuchung cytologisch-histologischen Materials nicht vermieden werden; eine Zuordnung der tracks zu bestimmten Strahlungsquellen wird erschwert. Da die maximale Energie von Tritium 18 KeV beträgt, können in einer ILFORD G5 Emulsion im Durchschnitt maximal 5.7 Silberkörner pro beta-Partikel generiert werden. Die zur Erkennung einer beta-track notwendige Anzahl von 4 Silberkörnern entspricht nach LEVI et al. (1963) einer Energie von 13.4 KeV. PERRY (1964) konnte zeigen, daß diese Energie im kontinuierlichen beta-Spektrum des Tritiums nur von 4.7 % der beta-Partikel erreicht wird. Eine quantitative beta-track Autoradiographie ist somit bei der Verwendung von Tritium unmöglich. Selbst bei einer Verwendung von

Kohlenstoff-14 (E_{max} = 156 KeV) muß nach DÖRMER und BRINKMANN (1972) die erwartete Poisson-Verteilung mathematisch korrigiert werden, da nach LEVI et al. (1963) 14 % aller beta-Partikel nicht genug Energie besitzen, um eine beta-Spur zu generieren.

Somit verbleibt für eine quantitative Analyse in der Tritium-Autoradiographie nur die Methode der 'grain density'.

4.7.2 Grain density

Hierunter versteht man die Bestimmung der Silberkorndichte in der Photoemulsion pro Flächeneinheit des untersuchten Materials.

Wie schon oben erwähnt, können hier zwei unterschiedliche Verfahren, Stripping-Film (Emulsionsschicht plus Gelatineträgerfolie) oder Dippingtechnik (flüssige Emulsion) angewendet werden. Prinzipiell sollte bei einer quantitativen Autoradiographie im Vergleich mehrerer Präparate eine konstante Dicke der Emulsion angestrebt werden. Dies gilt vor allem bei der Verwendung höher energetischer beta-Strahler, da hier die Reichweite die Dicke der Emulsion übersteigt.

In der Tritiumautoradiographie spielt diese Dicke eine nicht so entscheidende Rolle, da aufgrund der geringen Energie die Reichweite sehr begrenzt ist. Eine Emulsion konstanter Dicke (5 µm) bietet der KODAK AR 10 Stripping-Film, dessen Verhalten in zahlreichen Veröffentlichungen (z.B. PELC, 1947, 1956; HERZ, 1951) beschrieben wird. SCHMID (1965); GATZKE und JENNISSEN (1975) zeigten, daß die Dicke der Emulsion und damit die Absorption der beta-Strahlung eine Funktion der Feuchtigkeit und der

Temperatur ist.
Dies erfordert die Mitführung eines Standards, wenn quantitative Aussagen getroffen werden.
In dieser Arbeit wurde die Dipping-Technik bevorzugt, da erstens die Reichweite der Tritiumstrahlung sehr gering ist und zweitens geometrische (Kontakt Emulsion-Probe) und temperaturbedingte Fehler vermieden werden. Zur Kontrolle wurde außerdem ein Methacrylat-Standard mitgeführt. Prinzipiell ist jedoch für jede Isotop-Emulsionskombination bei konstanten Randbedingungen (d.h. Geometrie, Temperatur, Feuchtigkeit) die Anzahl der durch ein beta-Partikel erzeugbaren Silberkörner konstant.

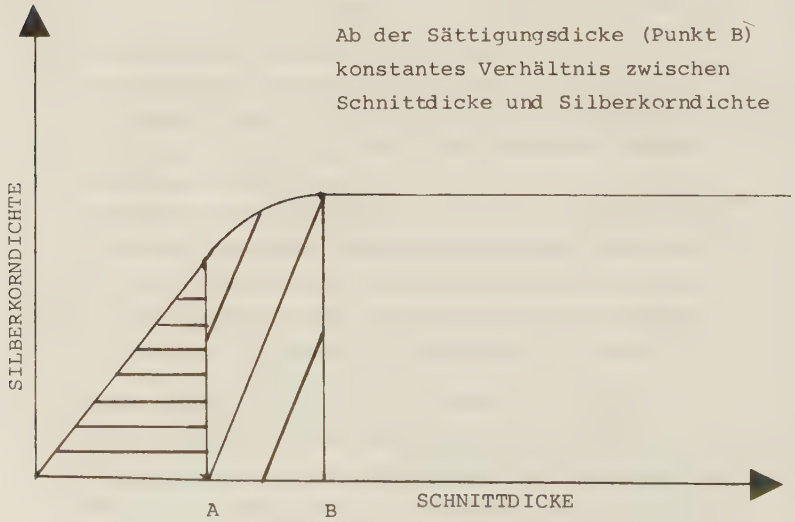


ABBILDUNG 10)
Silberkorndichte als Funktion der Schnittdicke
linear bis zum Punkte A
exponentiell zwischen A und B

Abbildung 10) zeigt die von MAURER und PRIMBSCH sowie FALK, KING und ROGERS ermittelte Silberkorndichte in Abhängigkeit von der Schnittdicke bei uniform-markierten Schnitten, die mit KODAK-NTB2-Emulsion beschichtet wurden. Von einer bestimmten Schnittdicke (siehe Pkt. B) an, bleibt die gemessene Silberkornzahl auch bei größer werdender Dicke des Schnittes konstant. Diejenige Schnittdicke, bei der dieser stationäre Zustand in der Silberkornbelegung eintritt, wird als Sättigungsdicke bezeichnet.

Bei reproduzierbaren experimentellen Bedingungen kann somit durch Bestimmung der Anzahl der Silberkörner eine Aussage über die inkorporierte Radioaktivität gemacht werden.

Abbildung 11 (Siehe Seite 40) gibt einen Überblick der verschiedenen Bestimmungsmöglichkeiten und ihrer Grenzen.
In dieser Abbildung erscheint die densitometrische Bestimmung der Silberkorndichten als die eleganteste, da bis zu hohen Dichten ein lineares Verhältnis zwischen Photometermesswert und Silberkorndichte besteht. ARENS et al. (1931) und KLEIN (1958) konnten zeigen, daß dieses lineare Verhältnis bis zu einer Silberkorndichte von 10^9 / cm^2 gilt. Aus den schon oben diskutierten Fehlermöglichkeiten in der Autoradiographie ist ersichtlich, daß dies für das Verhältnis Radioaktivität - Silberkorn nicht gelten kann.

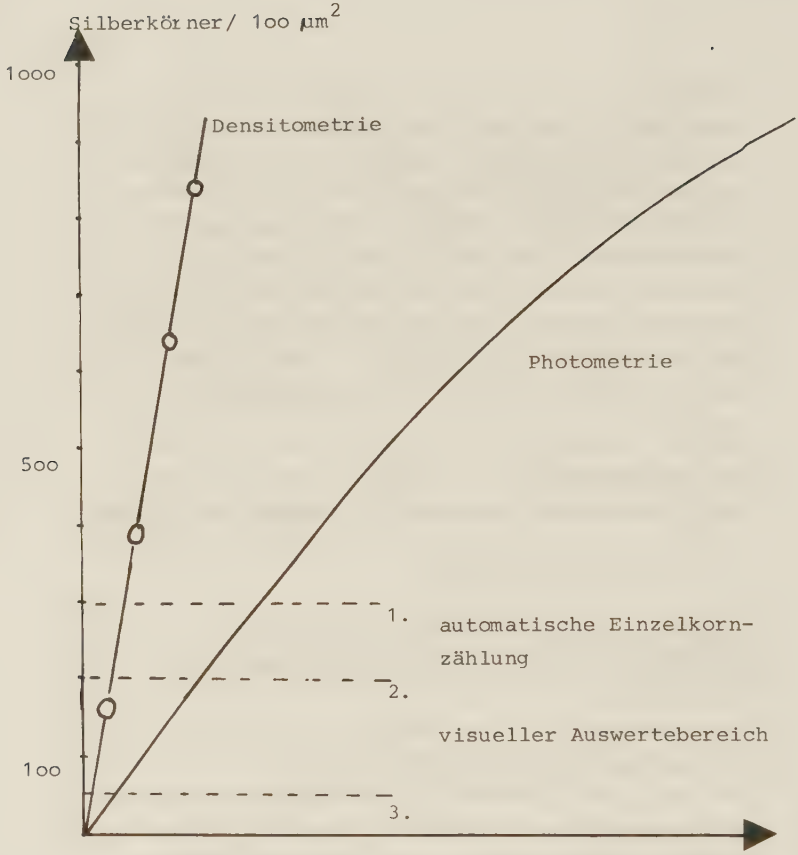


ABBILDUNG 11)

Übersicht der Auswertemöglichkeiten zur Bestimmung der Silberkorndichten

1. WOOLSEY,T.A. et al. (1978)
   WANN,D.F. et al. (1974)
   LIPKINS,L.E. et al. (1974)
   ENTINGH,D.J. et al. (1975)
2. MAI,J.K. et al. (198o)
   DÖRMER,P. et al. (1972)
   SJÖSTRAND,J.et al. (1969)
   TAYLOR,J.H. (1956)
3. APPLETON,T.C. (1966)
   HENDRICKSON,A.E. et al. (1972)
   LEVI,H. (1957)

Untersuchungen von BOYD (1955), BECKER (1962) und HERZ (1968) zeigen, daß bei der Verwendung von KODAK AR10 Stripping-Film nur die Silberkorndichten erreicht werden, bei denen ein lineares Verhältnis zwischen inkorporierter Aktivität und Silberkornzahl noch existiert. Leider muß für die densitometrische Auswertung eine Trennung von Film und Präparat erfolgen, so daß eine zelluläre Zuordnung der Strahlung nur bei der Untersuchung einzelner Zellen möglich ist. Histologisch strukturbezogene Untersuchungen sind so nicht durchführbar. Außerdem ist bei der in dieser Arbeit verwendeten Dipping-Technik eine Trennung von Objekt und Emulsion unmöglich. Eine Untersuchung der Silberkorndichte im Durchlichtverfahren ist durch die unterschiedliche Absorption der verschiedenen Strukturen histologischer Präparate erschwert.

Schon früh wurde deshalb eine Bestimmung der Silberkorndichten im Auflichtverfahren durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden alle Störungen durch Struktur oder Färbung des zu untersuchenden Materials vermieden. Nach einer Untersuchung von GOLDSTEIN und WILLIAMS (1971) werden 3 % des einfallenden Lichtes von den Silberkörnern reflektiert. Diese geringe Menge fordert bei einer quantitativen Erfassung des reflektierten Lichtes, z.B. mit Hilfe eines Photomultipliers eine Spannungskonstanthaltung von Lampe und Photometer wie sie in der Versuchsanordnung dieser Arbeit gewährleistet ist.

ROGERS (1961, 1967), DÖRMER et al. (1966) und DÖRMER (1972) untersuchten die Korrelation zwischen reflektiertem Licht und der Anzahl der Silberkörner.

Die von DÖRMER (1972) postulierte lineare Abhängigkeit in niederen Silberkornbereichen bis zu ca. 200 Silberkörnern pro 100 μm^2, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. DÖRMER zeigte weiterhin, daß bei höheren Silberkorndichten dieses lineare Verhältnis zwischen Photometersignal und Silberkorndichte nicht mehr gültig ist. Ihm gelang es,durch einen exponentiellen Ansatz

$$Sk_{phot} = Sk_{sätt} \ (1 - e^{sk_w/sk_{sätt}})$$

die aus den Photometerwerten folgende Silberkorndichte bei der Verwendung eines KODAK AR10 Stripping-Films in die tatsächliche Silberkorndichte umzurechnen. Hierbei entspricht Sk_{phot} der aus dem Photometersignal folgenden Silberkorndichte, $Sk_{sätt}$ der Silberkorndichte bei Photometersignalsättigung und Sk_w der tatsächlichen Silberkorndichte. Beim AR10 Stripping-Film liegt die Sättigungsdichte bei 950 Silberkörnern pro 100 μm^2. Eine quantitative Angabe der inkorporierten Radioaktivität ist aufgrund der oben angeführten Fehlermöglichkeiten durch die Bestimmung der Silberkorndichte allein nicht möglich.

In der Neuroanatomie sind bei autoradiographischen Studien meist sehr lange Expositionszeiten erforderlich, weil auch schwächer markierte Areale abzugrenzen sind. Es müssen deshalb hohe und niedrige Silberkorndichten im gleichen Präparat aufeinander bezogen werden. Die in Abbildung 11) gezeigten Möglichkeiten einer visuellen oder automatischen Einzelkornzählung müssen hier zwangsläufig versagen, da in höher markierten Arealen eine Abgrenzung des Einzelkorns unmöglich ist. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die von DÖRMER

vorgeschlagene Reflexionsmessung des Lichtes mit einer Mikroskopphotometereinrichtung vorgenommen. Auf eine exakte numerische Bestimmung der Silberkorndichten höher markierter Areale konnte hierbei verzichtet werden, da die Meßwerte als Funktion der Zeit T und einer Quellaktivität bekannter Größe bestimmt wurden.

5. Zusammenfassung

Das in dieser Arbeit entwickelte mathematisch/empirische Modell gestattet die Bestimmung einer inkorporierten Radioaktivität aus den Photometermesswerten und der Expositionszeit T. Fehlermöglichkeiten der Autoradiographie, die durch die Expositionszeit oder Präparation bedingt sind, werden durch das empirische Modell berücksichtigt. Es wird gezeigt, daß der beim alleinigen Vergleich der Photometermesswerte entstehende Fehler von ca. 400 % korrigiert werden kann. Der Gültigkeitsbereich des Modells ist die Neuroanatomie, da zu seiner Entwicklung Nervi optici - also neuroanatomisches Material - verwendet wurde. Eine Übertragung auch auf übrige Abschnitte des Zentralnervensystems erscheint aufgrund der dadurch erreichbaren Fehlerreduktion gerechtfertigt.

Appleton, T.C.
Resolving power, sensibility and latent image fading of soluble-compound autoradiographs.
J. Histochem. 14, pp 414-420 (1966)

Arens, H.; Eggert, J.; Heisenberg, E.
Zusammenhang zwischen Schwärzung, Silbermenge, Deckkraft, Kornzahl und Korndimension entwickelter photographischer Schichten.
Z. wiss. Photogr. 28, pp 356-366

Barnard, E.A.

Int. Rev. Cytol. 29, pp (1970)

Barnard, E.A.; Ostrowski, K.
Autoradiographic methods in enzyme cytochemistry. 11. Studies on some properties of acetylcholinesterase in its sites at the motor endplate.
Exp. Cell Res. 36, pp 28-42 (1964)

Rogers, A.W.; Darzynkiewicz, Z.; Barnard, E.A.; Salpeter, M.M.
Number and location of acetylcholinesterase molecules at motor endplates of the mouse.
Nature (London) 210, pp 1003-1006 (1966)

Baserga, R.
Autoradiographic methods
In: H. Busch (ed.)
Methods in cancer research
Vol. I New-York-London, Academic Press
pp 45-116 (1967)

Becker, K.
Filmdosimetrie
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1962

Blackett, N.M.; Kember, N.F.; Lamerton, L.F.
The measurement of radiation dosage distribution by autoradiographic means with reference to the effect of bone-seeking isotopes.
Lab. Invest. 8, pp 171-178 (1959)

Boyd, G.A.
Autoradiography in biology and medicine.
New-York: Academic Press (1955)

Cowan, W.M.; Gottlieb, D.I.; Hendrickson, A.E.; Price, J.L.; Woolsey, T.A.
The autoradiographic demonstration of axonal connections in the central nervous system.
Brain Res. 37, pp 21-51 (1972)

De Juan, C.; Carreres, J.
Number, diameter and distribution of the rat optic nerve fibers.
Acta anat. 102, pp 294-299 (1978)

Deuchar, E.M.
Staining sections before autoradiographic exposure: Excessive background graining caused by celestin blue.
Stain Technology 37, pp 324-328 (1962)

Dörmer, P.
Photometric Methods in Quantitation of Light Microscope Radioautography.
J. of Histochem. and Cytochem. 27, No 11, pp 1529-1530 (1979)

Dörmer, P.; Brinkmann, W.
Quantitative ^{14}C-Autoradiographie einzelner Zellen.
Histochemie 29, pp 248-264 (1972)

Dörmer, P.; Brinkmann, W.; Stieber, A.; Stich, W.
Automatische Silberkornzählung in der Einzelzell-radiographie. Eine neue photometrische Methode für die quantitative Autoradiographie.
Klin. Wschr. 44, pp 477-482 (1966)

Dörmer, P.; Reichart, B.; Huhn, D.
Kerntrockengewicht und Beteiligung von ^{3}H-Thymidin an der DNS-Synthese in Einzelzellen der regenerierenden Rattenleber.
Z. Zellforsch. 86, pp 559-570 (1968)

Doniach, I.; Pelc, S.R.
Autoradiograph technique
Brit. J. Radiol. 23, pp 184-192 (1950)

Droz, B.; Leblond, C.P.
Axonal migration of proteins in the central nervous system and peripheral nerves as shown by radioautographie.
J. Comp. Neur. 121, pp 325-346 (1963)

Droz, B.; Rambourg, A.; Koenig, H.L.
The smooth endoplasmic reticulum: Structure and role in the renewal of axonal membrane and synaptic vesicles by fast axonal transport.
Brain Res. 93 pp 1-13 (1975)

Entingh, D.J.; Capowski, J.J.
Automatic silver grain counting with area accumulation.
Anat. Cytology Conf., Asimolar, Calif. (1975)

Evans, R.D.
Interactions of and ß particles with matter.
In: T.F. Dougherty, W.S.S. Jee, C.W. Mays and B.J. Stover (eds.)
Some aspects of internal irradiation.
Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press (1962)

Falk, G.J.; King, R.C.
Radioautographic efficiency for tritium as a function of section thickness.
Radiat. Res. 20, pp 466-470 (1963)

Fitzgerald, P.J.; Eidinoff, M.L.; Knoll, J.E.; Simmel, E.B.
Tritium in autoradiography
Science 114, pp 494-498 (1951)

Gatzke, H.D.; Jennissen, J.J.
Ein Beitrag zur Artefaktbildung in der Autoradiographie.
Acta histochem. 56, pp 325-334 (1976)

Gerard, R.W.
Nerve metabolism.
Phyiol. Rev. 12, pp 469-592 (1932)

Glendenin, L.E.; Solomon, K.A.
Self-absorption and backscattering of beta-radiation.
Science 112, pp 623-626 (1950)

Goldstein, D.J.; Williams, M.A.
Quantitative autoradiography: An evaluation of visual grain counting, reflectance microscopy, gross absorbance measurements and flying spot microdensitometry.
J. Microscopy 94, pp 215-239 (1971)

Hendrickson, A.
Electron microscopic radioautography: Identification of origin of synaptic terminals in normal nervous tissue.
Science 165, pp 194-196 (1969)

Hendrickson, A.; Wagoner, N.; Cowan, W.M.
An autoradiographic and electron microscopic study of retino hypothalamic connections.
Z. Zellforsch. 135, pp 1-26 (1972)

Hermann, W.; Hartmann, G.; Brust, R.
Das Auflösungsvermögen mikroautoradiographischer Aufnahmen in Abhängigkeit von der Energie der verwendeten beta-Strahlung (Teil I).
Atompraxis 9, pp 315-320 (1961)

Herz, A.H.
Photographic fundamentals of autoradiographiy.
Nucleonics 8, pp 24-39 (1951)

Herz, A.H.
The photographic action of ionizing radiations.
New York-London-Sydney-Toronto:
John Wiley & Sons Inc. (1969)

Hopf, A.; Eckert, H.
Verteilungsmuster marktierter Psychopharmaka
im Rattengehirn.
Acta histochem. Suppl. VIII, pp 343-348 (1968)

Klein, E.
Die Beziehung zwischen der Schwärzung und der
Größe der entwickelten Silberaggregate.
Z. Electrochem. 62, pp 993-999 (1958)

König, H.
The synthesis and peripheral flow of axoplasm.
Trans. Am. Neurol. Assoc. 83, pp 162-164 (1958)

Kopriwa, B. M.; Leblond, C.P.
Improvements in the coating technique of
radioautography.
J. Histochem. 10, pp 269-285 (1962)

Lajtha, L.G.; Oliver, R.
The application of autoradiography in the study of nuclei acid metabolism.
Lab. Invest. 8, pp 214-224 (1959)

Levi, H.
A discussion of recent advances towards quantitative autoradiography.
Exp. Cell Res. Suppl. 4, pp 207-221 (1957)

Levi, H.; Hogben, A.S.
Quantitative beta track autoradiography with nuclear track emulsions.
Dan. Mat.-Fys. Medd. 9 (1955)

Levi, H.; Rogers, A.W.; Weis Bentzon, M.; Nielsen, A.
On the quantitative evaluation of autoradiograms.
Kgl. Danske Videnskab. Selskab. Mat.-Fys. Medd. 33, No 11 (1963)

Levinthal, C.; Thomas, C.A., Jr.
Molecular autoradiography: The beta-ray counting from single virus particles and DNA molecules in nuclear emulsions.
Biochim. biophy. Acta (Amst.) 23, pp 453-465 (1957)

Lipkin, L.E.; Lemkin, P.; Carman, G.
Automated autoradiographic grain counting in human determined context.
J. Histochem. Cytochem. 22, pp 755-765 (1974)

Mai, J.
Quantitative Untersuchungen von Autoradiogrammen mit Hilfe der EDV zur Frage der Existenz einer retino-hypothalamischen Bahn bei der Albinoratte.
Verh. Anat. Ges. 71, pp 177-181 (1977)

Mai, J.; Junger, W.
Quantitative autoradiographic light- and electron-microscopic studies on the retino-hypothalamic connections in the rat.
Cell Tiss. Res. 183, PP 221-237 (1977)

Mai, J.; Jennissen, J.J.; Bartholomäus, I.; Krauthausen, I.
Ermittlung gewebsgebundener Radioaktivitäts-mengen durch quantitative Autoradiographie.
Antwerpen April 1980
75. Vers. der Anatom. Gesellschaft

Maurer, W.; Primbsch, E.
Größe der beta-Selbstabsorption bei der ^{3}H-Autoradiograhie.
Exp. Cell Res. 33, pp 8-18 (1964)

Maurer, W.; Schultze, B.
Problems in autoradiographic studies of DNA, RNA, and protein synthesis.
In: L.J. Roth and W.E. Stumpf (eds.), Autoradiography of diffusible substances.
New York-London: Academic Press, pp 15-28 (1969)

Moffat, D.J.; Youngberg, S.P.; Metcalf, W.K.
The validity of autoradiographic labeling.
Cell Tiss. Kinet. 4, pp 293-295 (1971)

Neely, E.J.; Combs, J.W.
Variation in the autoradiographic technique:
I. Emulsion-developer combinations assessed by photometric measurement of single silver grains.
J. of Histochem. and Cytochem.,pp 1057-1064 (1976)

Niklas, A.; Maurer, W.
Autoradiographie.
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der phyiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl., Bd. II, Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955, pp 734-773

Odeblad, E.
Contributions to the theory and technique of quantitative autoradiography with ^{32}P with special reference to the granulosa tissue of the Graafian follicles in the rabbit.
Acta radiol. (Stockh.), Suppl. 93, pp 1 - 123 (1952)

Oja, H.K.; Oja, S.S.; Hasan, J.
Calibration of stripping film autoradiography in sections of rat liver labelled with tritium.
Exp. Cell Res. 45, pp 1-10 (1966)

Orsulakova, A.; Jennissen, J.J; Meyer zum Gottesberge, A.
Autoradiography of diffusible substances and their application to the inner ear.
In: Inner ear biology, vol. 68, pp 193-200 (1977)

Pelc, S.R.
Autoradiograph technique.
Nature (Lond.) 160, pp 749-750 (1947)

Pelc, S.R.
The stripping-film technique of autoradiography.
Int. J. appl. Radiat. 1, pp 172-177 (1956)

Pelc, S.R.; Appleton, T.C.; Welton, N.E.
State of light autoradiography..
In: C.P. Leblond an K.B. Warren (eds.), The use of radioautography in investigating protein synthesis, New York-London: Academic Press (1965)

Pelc, S.R.; Welton, M.G.E.
Quantitative evaluation of tritium in autoradiography and biochemistry.
Nature (Lond.), 216, pp 925-927 (1967)

Perry, R.P.
Quantitative autoradiography.
In: D.M. Prescott (ed.), Methods in cell physiology, vol. I, New York: Academic Press (1964), pp 305-326

Rogers, A.W.
A simple photometric device for the quantitation of silver grains in autoradiographs of tissue sections.
Exp. Cell Res. 24, pp 228-239 (1961)

Rogers, A.W.
Techniques of autoradiography.
Amsterdam-London-New York: Elsevier Publishing Company 1967

Rogers, A.W.; Darzynkiewicz, Z. et al (siehe "B")

Rogers, A.W.; John, P.N.
Latent image stability in autoradiographs of diffusible substances.
In: L.J. Roth and W.E. Stumpf (eds.), Autoradiography of diffusible substances, New York-London: Academic Press (1969), pp 51-68

Sawyer, C.H.
Cholinesterase in degenerating and regenerating peripheral nerves.
Amer. J. Phys. 146, pp 246-253 (1946)

Samuels, A.J.; Boyarski, L.K.; Gerard, R.W.; Libet, B., Burst, M.
Distribution, exchange and migration of phosphate compounds in the vervous system.
Amer. J. Physiol. 164, pp 1-15 (1951)

Salpeter, M.M.; Bachmann, L.
Autoradiography with the electron microscope. A procedure for improving resolution, sensitivity and contrast.
J. Cell. Biol. 22, pp 469-477 (1964)

Schmid, W.
Autoradiography of human chromosomes.
In: J.J. Yunis (d.), Human chromosome methodology, New York-London: Academic Press (1965) pp 91-110

Schultze, B.; Maurer, W.
Größe der RNS-Synthese in Nekleolus und Karyoplasma bei einigen Zellarten der Maus.
Z. Zellforsch. 60, pp 387-ff (1963)

Stillström, J.
Grain count corrections in autoradiography.
Int. J. appl. Radiat. 14, pp 113-118 (1963)

Stillström, J.
Grain count vorrections in autoradiography-II.
Int. J. appl. Radiat. 16, pp 357-363 (1965)

Sjöstrand, J.; Karlsson, J.O.
Axoplasmic transport in the optic nerve and tract of the rabbit. A biochemical and radioautographic study.
J. Neurochem. 16, pp 833-844 (1969)

Stöcker, E.; Müller, H.A.
Zur chemischen Induktion von Silberkörnern im Strippingfilm bei der Orcein-Quetsch-Technik.
Histochemie 11, pp 167-170 (1967)

Taylor, J.H.
Autoradiography at the cellular level.
In: Physical techniques in biological research.
Ed. Oster and Pollister Vol. III Academic Press
New York (1956)

Wann, D.F.; Price, J.L.; Cowan, W.M.; Agulnek, M.A.
Automatic system for counting silver grains in autoradiographs.
Brain Res. 81, pp 31-58 (1974)

Woolsey, T.A.; Dierker, M.L.
Computer-assisted recording of neuroanatomical data.
In: Neuroanatomical research techniques.
Robertson, R.T. (ed.)
Academic Press: New York-San Francisco-London
(1978)

Yankwich, P.E.; Weigl, J.W.
The relation of backscattering to self-absorption in routine beta-ray measurements.
Science 107, pp 651-653 (1948)

Young, J.Z.
The history of the shape of a nerve fiber.
In: Essays on growth and form, pp 41-94.
Ed. W.E. Le Cros Clark and P.B. Medawer.
Clarendon Press: Oxford (1945)

Zajak, B.; Ross, M.A.S.
Calibration of electron-sensitive emulsions.
Nature (Lond.) 164, pp 311-312 (1949)

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. A. Hopf, danke ich sehr herzlich für seine geduldige und fördernde Betreuung.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Professor Dr. W. Hilscher, der maßgeblich mit zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Außerdem danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. J. K. Mai für seine fruchtbaren Anregungen zu diesem Thema.

L e b e n s l a u f

Geb. 21.06.1946	in Myhl als Sohn des Kaufmanns Peter Jennissen und seiner Ehefrau Maria, geb. Krappen
1952 - 1956	Volksschule Heinsberg
1956 - 1957	Kreisgymnasium Heinsberg
1957 - 1965	Max-Planck-Gymnasium Gelsenkirchen-Buer
1965	Abitur am Max-Planck-Gymnasium
Wintersemester 1965/66	Beginn des Physikstudiums an der RWTH Aachen
29.04.1968	Diplomvorprüfung
29.10.1971	Diplomhauptprüfung Physik
1.11.1972 - 30.09.1979	Wiss. Angestellter des C.& O. Vogt Institut für Hirnforschung der Universität Düsseldorf
Wintersemester 1973/74	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Düsseldorf
21.03.1975	Physikum
April/Mai 1979	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 1978 - März 1979	Prakt. Jahr in den Städt. Krankenanstalten Krefeld; 4 Monate Intensiv, Prof. Dr. Grosser 4 Monate Chirurgie, Prof. Dr. Schega 4 Monate Augen, Prof. Dr. Niedermeier
März 1979 - Sept. 1979	Wiss. Angestellter im Institut für Hirnforschung der Universität Düsseldorf
Ab 1.10.1979	Assistenzarzt beim AOK Strahleninstitut, Köln

Druck: Walter Kleikamp, Zülpicher Str. 205, 5000 Köln 41 (Sülz), Tel.: 44 23 72